

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 木谷 友哉

### 論文題目

Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis.

### 論文内容の要旨

ミトコンドリアの異常は糖尿病、がん、心血管障害、神経変性疾患などの様々な疾患の病態に関与している。再生医療の1つの方法論としての細胞移植の作用機序に関して、細胞間のミトコンドリア移行の可能性が示唆されており、また、特定の哺乳類細胞においては、単離したミトコンドリアと共培養することで、単離ミトコンドリアが細胞内に移行することが示唆されている。しかし、哺乳類細胞が単離ミトコンドリアを取り込むという現象が一般化できるのかどうか、およびその移行機序に関しては不明であった。

そこで我々はミトコンドリア移行シグナルをもつ赤色蛍光タンパク質を恒常的に発現するヒト子宮内膜由来間葉系細胞株を樹立し、これらの細胞から単離した蛍光ミトコンドリアを用いて、哺乳類細胞の単離ミトコンドリアを取り込む能力に関する検討を行った。

単離した DsRed 陽性ヒトミトコンドリアを GFP 陽性ラット H9C2 細胞と 24 時間共培養すると、GFP 陽性細胞内に DsRed 陽性ミトコンドリアが出現した。これらの細胞の蛍光免疫染色画像の 3 次元再構築を行うと、ラット細胞内にミトコンドリア外膜が保たれた状態の DsRed 陽性ヒトミトコンドリアが存在していることが明らかになった。さらに、共培養後のラット細胞ではヒト由来のミトコンドリア DNA が有意に増加していた。

同様に、単離した DsRed 陽性ヒトミトコンドリアをヒト子宮内膜由来間葉系細胞株 (EMCs) と共培養すると、DsRed 陽性ミトコンドリアが細胞内に出現した。これらの細胞を固定し、透過型電子顕微鏡で観察したところ、DsRed 蛋白は細胞内のミトコンドリアに集積していること、また一部の DsRed 陽性ミトコンドリアはオートファジーにより分解されていることが明らかになった。5, 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  の DsRed 陽性単離ミトコンドリアと EMCs の共培養を行い、イメージングサイトメーターにてミトコンドリアが移行した細胞を評価すると、共培養を行ったミトコンドリアの量に依存して 4.3%, 18.9%, 27.6% と増加することが明らかになった。フローサイトメーターを用いた解析でも同様に 7.6%, 19.8%, 38.3% と量依存性にミトコンドリア取り込みの増加が認められた。

細胞内に移行したミトコンドリアを追跡するために、蛍光シグナルを経時的に蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターにて観察したところ、7 日後には蛍光シグナルはほぼ消失す

ることが明らかになった。さらに、タイムラプス撮像にて共培養開始後 1-2 時間後には細胞内にミトコンドリアが移行し始めること、細胞内に移行したミトコンドリアは核の周囲に集積し、細胞に保持され続けていることが明らかになった。

単離ミトコンドリアの細胞内移行が細胞に与える影響を検討するため、ミトコンドリア DNA 欠失細胞 ( $\rho 0$  細胞) を作成し、2.5, 5, 10, 25  $\mu\text{g/ml}$  の単離ミトコンドリアと 24 時間の共培養を行った。共培養後 3 日目には 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  の、7 日目には 2.5, 5  $\mu\text{g/ml}$  の単離ミトコンドリアと共培養を行った  $\rho 0$  細胞で有意に cell viability の改善を認めた。一方 25  $\mu\text{g/ml}$  の単離ミトコンドリアや UV 照射を行った単離ミトコンドリアと共培養を行った  $\rho 0$  細胞では改善効果は認められなかった。次に細胞外フラックスアナライザーを用いて、6, 12, 24  $\mu\text{g/ml}$  の単離ミトコンドリアと共培養を行った 3 日後に  $\rho 0$  細胞のミトコンドリア機能評価を行った。12, 24  $\mu\text{g/ml}$  の単離ミトコンドリアと共培養を行った  $\rho 0$  細胞では改善効果は認められなかったが、6  $\mu\text{g/ml}$  の単離ミトコンドリアと共培養を行った  $\rho 0$  細胞においては基礎酸素消費速度、最大酸素消費速度において有意な改善が認められた。この結果より、外来ミトコンドリアが宿主細胞の代謝に介入することが可能であることが示唆された。

ミトコンドリア移行の機序を調べるため、エンドサイトーシスの阻害剤を用いた検討を行った。マクロピノサイトーシスの阻害剤である EIPA により EMCs を前処理したところ、細胞内に移行するミトコンドリアが減少することが明らかになった。フローサイトメーターでは、無処理では 24.5% の細胞に蛍光ミトコンドリアが移行していたが、EIPA 25, 50  $\mu\text{M}$  で処理を行うと、各々 6.5%, 0.3% に減少した。またサイトカラシン D、ノコダゾールによっても細胞内に移行するミトコンドリアは減少したが、クロルプロマジンでは変化が認められなかった。EIPA で処理を行った  $\rho 0$  細胞と単離ミトコンドリアの共培養では、cell viability の改善効果も認められなかった。

本研究により、今までに報告されていなかった哺乳類細胞においても、単離ミトコンドリアを内在化する機能を有していることが明らかになった。単離されたミトコンドリアは細胞内に取り込まれる物質としては比較的大きいにも拘らず、単純な共培養のみで多数のミトコンドリアが細胞内に移行することが確認された。真核細胞のミトコンドリアの起源は細胞内に共生した別の細胞に由来するとされており、今回観察された単離ミトコンドリアの細胞内への移行は興味深い現象であると考えられる。単離ミトコンドリアの移行により細胞のミトコンドリア機能および cell viability が改善したこと、細胞内に移行したミトコンドリアはマクロピノサイトーシスの阻害剤により減少したことから、現在の哺乳類細胞にもミトコンドリアを内在化して利用できるなんらかの機構が存在しており、その機構はマクロピノサイトーシスと共通する経路を介している可能性が示唆された。